

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-500863

(43) 公表日 平成10年(1998) 1月27日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
9/56		9152-4B	9/56	
// (C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 R 1:10)				

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願平8-500873
(86) (22) 出願日 平成7年(1995) 5月5日
(85) 翻訳文提出日 平成8年(1996) 11月27日
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 5 / 0 5 6 3 5
(87) 国際公開番号 W O 9 5 / 3 3 0 5 6
(87) 国際公開日 平成7年(1995) 12月7日
(31) 優先権主張番号 2 5 0 , 0 2 8
(32) 優先日 1994年 5月27日
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ノース・キャロライナ・ステイト・ユニヴァーシティ
アメリカ合衆国、27695-7003 ノース・キャロライナ、ローリー、ホラデー・ホール 103、キャンパス・ボックス 7003
(72) 発明者 シー, ジェイソン・シー・エイチ
アメリカ合衆国、27511 ノース・キャロライナ、ケアリー、プランターズ・ウッド・レイン 100
(74) 代理人 弁理士 奥山 尚男 (外 3 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パチルス・リチエニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1 のケラチナーゼをコードしている DNA

(57) 【要約】

ケラチナーゼをコードしている単離 DNA が開示されている。単離 DNA は、(a) 図 1 のパチルス・リチエニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1 のケラチナーゼ酵素をコードしている単離 DNA と、(b) 上記 (a) の DNA とハイブリッド形成し、パチルス・リチエニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) NCIB 6816 のズブチリシンカールスベルグセリンプロテアーゼとハイブリッド形成しないオリゴヌクレオチドプローブとハイブリッド形成する単離 DNA と、および (c) 遺伝子コードの縮重によりヌクレオチド配列が上記 (a) および (b) の単離 DNA と異なり、かつケラチナーゼ酵素をコードしている単離 DNA とのうちのいずれかである。

```

90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100
2101
2102
2103
2104
2105
2106
2107
2108
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2130
2131
2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158
2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165
2166
2167
2168
2169
2170
2171
2172
2173
2174
2175
2176
2177
2178
2179
2180
2181
2182
2183
2184
2185
2186
2187
2188
2189
2190
2191
2192
2193
2194
2195
2196
2197
2198
2199
2200
2201
2202
2203
2204
2205
2206
2207
2208
2209
2210
2211
2212
2213
2214
2215
2216
2217
2218
2219
2220
2221
2222
2223
2224
2225
2226
2227
2228
2229
2230
2231
2232
2233
2234
2235
2236
2237
2238
2239
2240
2241
2242
2243
2244
2245
2246
2247
2248
2249
2250
2251
2252
2253
2254
2255
2256
2257
2258
2259
2260
2261
2262
2263
2264
2265
2266
2267
2268
2269
2270
2271
2272
2273
2274
2275
2276
2277
2278
2279
2280
2281
2282
2283
2284
2285
2286
2287
2288
2289
2290
2291
2292
2293
2294
2295
2296
2297
2298
2299
2300
2301
2302
2303
2304
2305
2306
2307
2308
2309
2310
2311
2312
2313
2314
2315
2316
2317
2318
2319
2320
2321
2322
2323
2324
2325
2326
2327
2328
2329
2330
2331
2332
2333
2334
2335
2336
2337
2338
2339
2340
2341
2342
2343
2344
2345
2346
2347
2348
2349
2350
2351
2352
2353
2354
2355
2356
2357
2358
2359
2360
2361
2362
2363
2364
2365
2366
2367
2368
2369
2370
2371
2372
2373
2374
2375
2376
2377
2378
2379
2380
2381
2382
2383
2384
2385
2386
2387
2388
2389
2390
2391
2392
2393
2394
2395
2396
2397
2398
2399
2400
2401
2402
2403
2404
2405
2406
2407
2408
2409
2410
2411
2412
2413
2414
2415
2416
2417
2418
2419
2420
2421
2422
2423
2424
2425
2426
2427
2428
2429
2430
2431
2432
2433
2434
2435
2436
2437
2438
2439
2440
2441
2442
2443
2444
2445
2446
2447
2448
2449
2450
2451
2452
2453
2454
2455
2456
2457
2458
2459
2460
2461
2462
2463
2464
2465
2
```

【特許請求の範囲】

1. (a) 図1のバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1のケラチナーゼ酵素をコードしている単離DNAと、

(b) 上記 (a) のDNAと同じハイブリッド形成条件でハイブリッド形成するが、バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) NCIB 6816のズブチリシンカールスベルグセリンプロテアーゼをコードするDNAと同じハイブリッド形成条件でハイブリッド形成しないオリゴヌクレオチドプローブとハイブリッド形成する単離DNAと、

(c) 遺伝子コードの縮重によりヌクレオチド配列が上記 (a) および (b) の単離DNAと異なり、かつケラチナーゼ酵素をコードしている単離DNAとから成るグループから選択されるケラチナーゼをコードしている単離DNA。

2. 図1のバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1のケラチナーゼ酵素をコードしている請求項1記載の単離DNA。

3. 図1のDNA配列を持つ請求項1記載の単離DNA。

4. ベクターDNAと、ケラチナーゼ酵素をコードしている上記請求項1の単離DNAとを含む組換えDNA分子。

5. 請求項4記載の組換えDNAを含み、コードされているタンパク質を発現できる宿主細胞。

6. コードされているケラチナーゼを発現させることが可能な条件下で請求項5記載の宿主細胞を培養して細胞培養物を得る工程と、上記細胞培養物から上記ケラチナーゼ酵素を収集する工程とを含むケラチナーゼ酵素の製造方法。

7. (a) 図1のバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1のケラチナーゼをコードしている単離DNAと、

(b) 60℃で0.3MのNaCl、0.03Mのクエン酸ナトリウム、0.1%のSDSの洗浄

の厳密さによって表される条件で、上記 (a) の単離DNAとハイブリッド形成し、上記 (a) の単離DNAと少なくとも65%が相同であり、かつケラチナーゼ酵素をコードしている単離DNAと、

(c) 遺伝子コードの縮重によりヌクレオチド配列が上記 (a) および (b)

) の単離DNAと異なり、かつケラチナーゼ酵素をコード化している単離DNAとから成るグループから選択されるケラチナーゼをコードしている単離DNA。

8. ベクターDNAと、ケラチナーゼ酵素をコードしている上記請求項7記載の単離DNAを含む組換えDNA分子。

9. 請求項8記載の組換えDNAを含み、コードされているタンパク質を発現できる宿主細胞。

10. コードされているケラチナーゼを発現させることが可能な条件下で請求項9記載の宿主細胞を培養して細胞培養物を得る工程と、上記細胞培養物から上記ケラチナーゼ酵素を収集する工程とを含むケラチナーゼ酵素の製造方法。

【発明の詳細な説明】

バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1の

ケラチナーゼをコードしているDNA

本発明は、USDA（米国農務省）からの補助金による政府援助を受けた。政府は本発明に対し特定の権利を有する。

技術分野

本発明は、バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1のケラチナーゼをコードしているDNAに関し、羽毛等のケラチンを分解し、それからアミノ酸を生成するのに有効なケラチナーゼの製造に役立つものである。

発明の背景

羽毛は、家禽産業によって大量に生産される。これらの羽毛は、利用範囲の広い原材料の安価な供給源である。数ある中で、動物飼料のアミノ酸と消化性タンパク質の安価な供給源として利用できるように、羽毛の分解方法の開発に大きな関心が寄せられてきた。現在までに開発されている羽毛を動物飼料に変換する方法には、蒸気による加水分解処理法と蒸気による加水分解処理と酵素処理を組み合わせた方法がある。Papadopoulos, M.C., *Animal Feed Science and Technology* 16:151 (1986)、Papadopoulos, M.C., *Poultry Science* 64:1729 (1985)、Alderibigde, A.O. et al., *J. Animal Science* 1198 (1983)、Thomas and Beeson, *J. Animal Science* 45:819 (1977)、Morris et al., *Poultry Science* 52:858 (1973)、Moran et al., *Poultry Science* 46:456 (1967)、Davis et al., *Processing of poultry by-products and their utilization in feeds, Part I*, USDA Util. Res. Rep. no.3, Washington, D.C. (1961) 参照のこと。これらの方法には、蒸気処理により熱に弱いアミノ酸が分解されたり、生成物の

消化性が比較的低い等の欠点があったことから、過酷な蒸気処理を必要としない経済的で新しい羽毛分解法に対する関心は薄れなかった。従って、本発明の目的は、蒸気加水分解に依存しないケラチンに富む材料の加水分解法を提供することである。

更なる目的は、ケラチンに富む材料を高いアミノ酸収率でアミノ酸に変換する

方法を提供することである。

本発明の更なる目的は、消化性が高く、食物タンパク質およびアミノ酸の良質な供給源となる飼料成分として有用な羽毛の加水分解生成物を提供することである。

本発明の更なる目的は、飼料中のケラチンとその他のタンパク質の消化性を改善するための飼料添加物として利用可能なケラチナーゼ酵素を提供することである。

本発明の更なる目的は、食物アミノ酸源として羽毛の加水分解生成物を利用した経済的な動物飼料を提供することである。本発明の前記およびその他の目的と本発明の点は下記の概要、詳細な説明、例に詳細に説明されている。

発明の概要

本発明の第一の点は、

(a) 図1（配列番号1）のバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1 (ATCC Accession No. 53757) のケラチナーゼをコードしている単離DNAと、

(b) 60℃で0.3MのNaCl、0.03Mのクエン酸ナトリウム、0.1%のSDSの洗浄の厳密さによって表される条件で、上記(a)の単離DNAとハイブリッド形成し、上記(a)の単離DNAと少なくとも65%が相同であり、かつケラチナーゼ酵素をコードしている単離DNAと、

(c) 上記(a)のDNAと同じハイブリッド形成条件でハイブリッド形成するが

バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) NCIB 6816のズブチリシンカールスベルグセリンプロテアーゼ（バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1の前記プロテアーゼはその変異型に思われる）をコードするDNAと同じハイブリッド形成条件でハイブリッド形成しないオリゴヌクレオチドプローブとハイブリッド形成する単離DNAと、

(d) 遺伝子コードの縮重によりヌクレオチド配列が上記(a)および(b)の単離DNAと異なり、かつケラチナーゼ酵素をコードしている単離DNAと

から成るグループから選択されるケラチナーゼをコードしている単離DNAである。

本発明の第二の点は、ベクターDNAとケラチナーゼ酵素をコードしている上記に示すDNAを含む組換えDNA分子である。

本発明の第三の点は、上記の組換えDNA配列を含み、コードされたケラチナーゼ酵素を発現できる宿主細胞である。

本発明の第四の点は、コードされたケラチナーゼを発現できる条件で上記宿主細胞を培養し、発現されたケラチナーゼを収集することによるケラチナーゼ酵素製造方法である。

本発明の前記およびその他の点は、下記の図、具体例、詳細な説明に詳しく説明されている。

図面の簡単な説明

図1は、バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1のケラチナーゼをコードしている単離DNAの配列とコードされているアミノ酸配列を示す図である。更に、図1は、バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1とバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) NCIB 6816のズブチリシンカールスベルグ遺伝子をコードしているアミノ酸の違いも示している。

発明の詳細な説明

本明細書に開示されているアミノ酸配列は左から右に、アミノ末端からカルボキシル末端の方向に表示されている。アミノ基とカルボキシル基は配列に表示されていない。ヌクレオチド配列は左から右に5'から3'の方向に一本鎖のみによって本明細書に表示されている。ヌクレオチドとアミノ酸は、37CFR1.822と確立された利用法に準じて、IUPAC-IUB生化学命名委員会によって推奨される方法で、あるいは(アミノ酸に関しては)3文字コードにより表されている。例えば、Patent In User Manual, 99-102 (1990年11月) (米国特許商標庁、Office of the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231) ; Hudson et al.の米国特許第4,871,670号、3欄の20~43行目を参照すること(本明細書に引

用されたこれらの文献は、引用することによって本明細書中に組み込むことを出願人は意図している）。

A. ケラチナーゼ酵素をコードしているDNA

DNAは、羽毛のようなケラチン供給源を分解するケラチナーゼ酵素をコードしている。この定義は、このDNAの天然の対立遺伝子の変異を含むことを意図している。ケラチナーゼの発現をコードしているその他のDNA配列と上記DNA配列とのハイブリッド形成が可能なハイブリッド形成条件は、一般に高度に厳密な (stringency) 条件である。例えば、このような配列は、60℃または70℃で0.3MのNaCl、0.03Mのクエン酸ナトリウム、0.1%のSDSの洗浄の厳密さによって表される条件で、標準的な in situ ハイブリッド形成分析において本明細書に開示されているDNAとハイブリッド形成することができる。J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第二版、1989年) (Cold Spring Harbor Laboratory) を参照。一般に、ケラチナーゼをコードしており、かつ本明細書に開示されているバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1のケラチナーゼをコードしているDNA配列とハイブリッド形成するDNA配列は、本明細書に開示されているケラチナーゼの配列と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%あるい

は95%以上相同である。

更に、前記配列によりコードされているものと同じケラチナーゼをコードしているが、遺伝子コードの縮重によりこれらとはコドン配列が異なるDNA配列（またはオリゴヌクレオチド）も本発明の一面をなす。遺伝子コードの縮重は、異なる核酸配列により同じタンパク質またはペプチドをコードするものであるが、文献にて公知である。例えば、Toole et al. の米国特許第4,757,006号、2欄、表1を参照。

前記配列によりコードされているものと同じケラチナーゼをコードしているが、部位指定変異誘起法によりこれらとはコドン配列が異なるDNA配列（またはオリゴヌクレオチド）も本発明の更なる一面をなす。ケラチナーゼ酵素の特性の改善に有用な部位指定突然変異誘起法は、下記に説明されているように公知である

。Kunkelの米国特許第4,873,192号を参照。

B. 遺伝子工学技術

遺伝子工学によるクローン化遺伝子、組換えDNA、ベクター、形質転換宿主細胞、タンパク質およびタンパク質断片の作製法は公知である。Bell et al. の米国特許第4,761,371号の6欄3行目から9欄65行目、Clark et al. の米国特許第4,877,729号の4欄38行目から7欄6行目、Schilling et al. の米国特許第4,912,038号の3欄26行目から14欄12行目、Wallner et al. の米国特許第4,879,224号の6欄8行目から8欄59行目を参照。

ケラチナーゼをコードしているDNAは公知の技術のいずれによっても作製できる。例えば、このDNAは、BIO-RAD社のMUTA-GENE™ Phagemid in vitro突然変異誘発キットを使用して構成することができる。このキットは、米国特許第4,873,192号においてKunkelにより報告されている方法に基づいている。(T. Kunkel, Proc Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985)、T. Kunkel et al., Methods in Enzymol. 154:367 (1987) も参照)。米国特許第4,873,192号は、二本鎖DNAの非突然

変異鎖に対する非常に強い選択法を提供する。DNAがdut⁻ ung⁻ 二重突然変異細菌の中で合成されると、新生DNAはdut突然変異の結果、チミンの位置に多くのウラシルを持ち、それによって酵素dUTPaseを不活化し、細胞内dUTP濃度が高くなる。ung突然変異はウラシルN-グリコシラーゼを不活化し、取り込まれたウラシルはDNAの中に残存できる。次に、このウラシルを含む鎖を、所望の突然変異を含むオリゴヌクレオチドによってプライム（開始）される相補鎖のin vitro合成の鋳型として利用する。得られた二本鎖DNAは能率的なウラシルN-グリコシラーゼを有する細胞内に形質転換され、ウラシルを含む鎖は高い効率で不活化され、ウラシルを含まない残存物質が残り、複製される（一般的な情報はBIO-RADカタログ番号170-3576使用マニュアルを参照）。

ケラチナーゼと調節要素をコードしているDNAを含むケラチナーゼ遺伝子は、選択された、あるいは標的となる核酸配列の増幅により構成される。増幅は適切な手段のいずれによっても実施できる。一般的には、D. Kwok and T. Kwok, Am

Biotechnol. Lab. 8:14 (1990) を参照。適切な増幅技術の例としては、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅（一般的には、G. Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392 (1992)、G. Walker et al., Nucleic Acids Res. 20:1691 (1992) 参照）、転写に基づく増幅（D. Kwok et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173 (1989) を参照）、自己保持配列複製（または「3SR」）（J. Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874 (1990) 参照）、Q β レプリカーゼ系（P. Lizardi et al., Biotechnology 6:1197 (1988) 参照）、核酸配列に基づく増幅（または「NASBA」）（R. Lewis, Genetic Engineering News 12 9:1 (1992) 参照）、修復連鎖反応（すなわち「RCR」）（上記R. Lewis参照）、およびブーメランDNA増幅（すなわち「BDA」）（上記R. Lewis参照）が含まれるが、これらに限定されない。

前記のようなDNA増幅技術には、目的の標的タンパク質をコードしているDNAに

特異的に結合するプローブ、1対のプローブまたは2対のプローブが含まれる場合がある。

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、公知の技術によって実施できる。例えば、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号、第4,800,159号および第4,965,188号を参照。一般に、PCRは、まずハイブリッド形成条件下に、検出すべき特異的配列の各鎖に対するあるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて（例えば熱に安定なDNAポリメラーゼの存在下に）核酸試料を処理すると、各核酸鎖に相補的な各プライマーの伸長生成物が合成される。プライマーはハイブリッド形成する特異的配列に十分に相補的であり、各プライマーから合成される伸長生成物は、その相補体から単離された場合には、もう一方のプライマーの伸長生成物合成の鋳型として利用できる。次に、検出すべき配列が存在する場合には、変性条件で試料を処理し、プライマー伸長生成物をそれらの鋳型から単離する。これらの段階は、目的の増幅量が得られるまで、周期的に反復される。増幅配列の検出は、反応生成物とハイブリッド形成できるオリゴヌクレオチドプローブ（例えば、本発明のオリゴヌクレオチドプローブ）を反応生成物に加えることによって実施でき、そのプローブとしては、検出可能な標識を付けたプローブを用いる。次に公知の技

術によって、あるいはゲル上で直接視認により標識を検出する。

リガーゼ連鎖反応 (LCR) も、公知の技術に従って実施される。例えば、R. Weiss, Science 254:1292 (1991) を参照。一般に、反応は2対のオリゴヌクレオチドプローブを用いて実施され、1対は検出されるべき配列の1本の鎖に結合し、もう1対は検出されるべき配列のもう1本の鎖に結合する。各対は共にその対応する鎖に完全に重なる。反応は、まず検出されるべき配列の鎖を変性させ (例えば単離し)、次に熱に安定なリガーゼの存在下に鎖を2対のオリゴヌクレオチドプローブと反応させ、オリゴヌクレオチドプローブの各対を共に結合させる。次に反応生成物を単離し、目的の量まで配列が増幅されるまでこの工程を周期的に

反復する。次に、PCRに関して記述されている方法により検出することができる。

ベクターは、複製可能なDNA構成物である。ベクターは、本明細書に示されるケラチナーゼをコードしているDNAを増幅するか、および/または本明細書に示されるケラチナーゼをコードしているDNAを発現するために使用される。発現ベクターは、複製可能なDNA構成物であり、ケラチナーゼをコードしているDNA配列が適切な宿主内でケラチナーゼを発現する適切な調節配列に操作可能のように結合されている。このような調節配列の必要性は、選択される宿主および選択される形質転換法によって異なる。一般に、調節配列には、転写プロモーター、転写を調節する選択されたオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードしている配列、転写および翻訳の終結を調節する配列が含まれる。

増幅ベクターは発現調節領域を必要としない。必要とされるのは、通常は複製起点によって賦与される宿主内複製能と、形質転換細胞の確認を促進する選択遺伝子だけである。

ベクターには、プラスミド、ウイルス (例えばアデノウイルス、サイトメガロウイルス)、ファージ、組み込み可能なDNA断片 (すなわち、組換えにより宿主ゲノムの中に組み込むことができる断片) が含まれる。ベクターは、宿主ゲノムとは独立に複製され、機能する。あるいは場合によってはゲノムそのものに組み

込まれる。発現ベクターは、発現されるべき遺伝子に操作可能なように結合し、宿主生物内で操作可能なRNA結合部位とプロモーターとを含まなくてはならない。

。

DNA領域は、機能的に互いに関係がある場合には、操作可能なように結合されるか、あるいは操作可能なように連結される。例えば、プロモーターは、それが配列の転写を調節している場合には、コーディング配列に操作可能なように結合されたり、あるいは、リボソーム結合部位は、それが翻訳できるように配置されている場合には、コーディング配列に操作可能なように結合される。

形質転換宿主細胞は、組換えDNA技術を用いて作製された本明細書に開示されて

いるDNA配列を含むベクターにより形質転換またはトランスフェクションされた細胞である。形質転換宿主細胞は、普通はケラチナーゼを発現するが、ケラチナーゼDNAをクローニングまたは増幅する目的で形質転換された宿主細胞は、ケラチナーゼを発現する必要はない。適切な宿主細胞には、本技術に精通する者にとって公知の原核生物宿主細胞のような宿主細胞が含まれる。

原核生物宿主細胞には、大腸菌 (*E. coli*) またはバチルス等のグラム陰性またはグラム陽性菌が含まれる。より高等な真核細胞には、下記の哺乳動物由来の確立された細胞系が含まれる。宿主細胞の例は、*E. coli* W3110 (ATCC 27,325)、*E. coli* B、*E. coli* X1776 (ATCC 31,537)、*E. coli* 294 (ATCC 31,446) 等である。広範にわたる適切な原核細胞と微生物のベクターが利用可能である。*E. coli*は典型的にpBR322を利用して形質転換される。組換え微生物発現ベクターにおいて最も多く利用されるプロモーターには、 β -ラクタマーゼ (ペニシリナーゼ) およびラクトースプロモーター系 (Chang et al., *Nature* 275:615 (1978) ; およびGoeddel et al., *Nature* 281:544 (1979))、トリプトファン (*trp*) プロモーター系 (Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.* 8:4057 (1980) およびヨーロッパ特許公報第36,776号) およびtacプロモーター (H.De Boer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21 (1983)) 含まれる。(原核宿主の発現に関する) プロモーターとシャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列は、ケラチナーゼを

コードしているDNAに操作可能なように結合される。すなわち、これらは、DNAからのケラチナーゼメッセンジャーRNAの転写を促進するように配置されている。

培養酵母等の真核微生物も、本明細書に開示されている単離DNAを持つベクターにより形質転換できる。例えば、米国特許第4,745,057号を参照。パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、より下等な真核宿主微生物の中では最も多く利用されるが、多くの他の菌株も一般的に利用可能である。酵母ベクターには、2ミクロンの酵母プラスミドからの複製起点または自律複製配列 (ARS)、プロモーター、

本明細書に記載されているケラチナーゼをコードしているDNA、ポリアデニル化のための配列、および転写終結のための配列、および選択遺伝子を含む。プラスミドの例としてYRp7がある (Stinchcomb et al., Nature 282:39 (1979) ; Kingman et al., Gene 7:141 (1979) 、Tschemper et al., Gene 10:157 (1980))

。酵母ベクター内の適切なプロモーター配列には、メタロチオネインのプロモーター、3-ホスホグリセレートキナーゼ (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073 (1980) またはその他の解糖酵素 (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7:149 (1968) およびHolland et al., Biochemistry 17:4900 (1978)) が含まれる。酵母での発現に利用される適切なベクターとプロモーターは、R. Hitzeman et al., ヨーロッパ特許公報第73,657号に詳細に記述されている。

C. ケラチナーゼ酵素の調製および利用法

上記のように、ケラチナーゼ酵素は、コードされているケラチナーゼを発現させることが可能な条件で上記のように宿主細胞を培養し、発現されたケラチナーゼを収集することによって、作製できる。宿主細胞は、細胞が増殖する条件で培養され、次いでコードされたケラチナーゼの発現を誘発する条件で培養できる。あるいは、細胞はコードされたケラチナーゼの発現と増殖とを同時に誘発できる。ケラチナーゼは適切な分泌リーダー配列に融合できる。あるいは培養培地内で発現させ、培地から収集できる。あるいはケラチナーゼを細胞内で発現させ、次いで細胞を溶解し、細胞溶解物からケラチナーゼを収集できる。一般に、培養し

てトランスジェニックしたタンパク質を発現させる適切な技術は全て利用でき、これは本技術に精通する者にとって公知である。

調製されたケラチナーゼ酵素は、ケラチンに富む材料の分解処理工程に有用である。具体的な加水分解処理工程は、Shih et al. の米国特許第5,063,161号および第4,959,311号に記載されており、これらは引用することによってすべて本明細書に組み込まれるものとする。前記のShih et al. の特許は、ケラチナーゼ酵素

を含む発酵培地を開示している。従って、本発明のケラチナーゼ酵素は発酵培地の調製に有用である。

調製されたケラチナーゼ酵素は、羽毛の加水分解生成物の生産にも利用できる。羽毛の加水分解生成物には幾つか利用法がある。例えば、加水分解された羽毛は、動物飼料の成分として利用できる。同様に、調製されたケラチナーゼ酵素そのものを動物飼料調製品に組み込むことができる。Shih et al. の米国特許第5,186,961号には、ケラチナーゼ酵素を含む動物試料の適切な調製法が開示されている。Shih et al. の米国特許第5,186,961号は、引用することによってすべて本明細書に組み込まれる。

調製されたケラチナーゼ酵素は、背景技術において上述されているように、羽毛生成物からのアミノ酸生成にも有用である。

本発明は、以下の限定することを意図したものではない具体例に詳細に説明されている。具体例は説明だけを目的としており、発明の範囲を限定するものではない。

例 1

PCR-ウォーキングによるバチルス・リチェニフォルミス (Bacillus Licheniformis) PWD-1からのケラチナーゼ遺伝子の単離と配列決定

本技術に精通する者にとって公知の技術に従って、臭化シアンを用いてケラチナーゼ酵素を切断する。その後、個々に対を成す一連のランダムプライマーと共に、N末端アミノ酸配列に対応する5'DNA (N10) 配列を固定プライマーとして使用し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行う。N10の下流に位置する25-merオリゴ

ヌクレオチドプローブとのハイブリッド形成により、N10とランダムプライマーの1つによって増幅された683bpのPCR生成物が得られ、これはケラチナーゼ遺伝子を含む部分として同定される。遺伝子の3'末端部分も、+548の位置に設定され、ランダムプライマーと対をなす第二の固定プライマー (I10) を用いて、同じ方法

で増幅、配列決定される。上流の配列分析も同様の方法で実施した。575bpの上流領域は、ランダムプライマーと対を成すアンチセンス10-mer固定プライマー (R10) を用いて、PCRにより増幅される。バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) のケラチナーゼ遺伝子と調節要素を含む完全な1,457bpの配列は、PCR産物の組み合わせにより決定される。

図1に示すように、同定された遺伝子は、バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) NCIB 6816のズブチリシンカールスベルグ遺伝子との類似性が高い。変更部分は、同定されたバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) のケラチン分解プロテアーゼの対応するアミノ酸配列の上に太字でアミノ酸のカールスベルグ遺伝子の違いとして明らかにされている。

配 列 表

(1) 一般的情報:

(i) 出願人: シー, ジェyson・シー・エイチ
リン, シャン
ミラー, エリック・エス

(ii) 発明の名称: バチルス・リチェニフォルミス (Bacillus Licheniformis) PWD-1のケラチナーゼをコードしているDNA

(iii) 配列の数: 2

(iv) 連絡先:

(A) あて先: Kenneth D. Sibley
(B) 街: Post Office Drawer 34009
(C) 市: シャーロット
(D) 州: ノース・キャロライナ
(E) 国: アメリカ合衆国
(F) 郵便番号: 28234

(v) コンピュータ読取可能な形式

(A) 媒体: フロッピーディスク
(B) コンピュータ: IBM PC 互換器
(C) オペレーティングシステム: PC-DOS/MS-DOS
(D) ソフトウェア: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) 本出願データ:

(A) 出願番号: US 08/250,028
(B) 出願日: 1994年5月27日
(C) 分類:

(viii) 代理人の情報:

(A) 氏名: Sibley, Kenneth D.
(B) 登録番号: 31,665
(C) 参照番号: 5051-260

(ix) 電子通信の情報:

(A) 電話番号: (919)420-2200
(B) ファクシミリ番号: (919)881-3175

(2) 配列番号: 1

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 1457塩基対
(B) 配列の型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起源:

- (A) 生物名: バチルス・リチニフォルミス (Bacillus Licheniformis)
 (B) 株名: PWD-1

(ix) 配列の特徴:

- (A) 存在を表す記号: CDS
 (B) 存在位置: 215..1354

(xi) 配列: 配列番号1

CTCCTGCCAA GCTGAAGCGG TCTATTCATA CTTTCGAACCT GAACATTTTT CTAAACAGT	60
TNNTAATAAC CAAAAAATTT TAAATTGGCC CTCCAAAAA ATAGGCCTAC CATATAATTC	120
ATTTTTTTTC TATAATAAAT TAACAGAATA ATTGGAATAG ATTATATTAT CCTTCTATTT	180
AAATTATTCT GAATAAAGAG GAGGAGAGTG AGTAATGATG AGGAAAAAGA GTTTTTGGCT	240
TGGGATGCTG ACGGCCTTCA TGCTCGTGTT CACGATGGCA TTCAGCGATT CCGCTTCTGC	300
TGCTCAACCG GCGAAAAATG TTGAAAAGGA TTATATTGTC GGATTTAAGT CAGGAGTGAA	360
AACCGCATCT GTCAAAAAGG ACGTCATCAA AGAGAGCGGC GGAAAAGTGG ACAAGCAGTT	420
TAGAATCATC AACGCAGCAA AAGCGAAGCT AGACAAAGAA GCGCTTAAGG AAGTCAAAAA	480
TGATCCGGAT GTCGCTTATG TGGAAGAGGA TCATGTGGCC CATGCCTTGG CGCAAACCGT	540
TCCTTACGGC ATTCCTCTCA TTAAAGCGGA CAAAGTGCAG GCTCAAGGCT TTAAGGGAGC	600
GAATGTAAAA GTAGCCGTCC TGGATACAGG AATCCAAGCT TCTCATCCGG ACTTGAACGT	660
AGTCGGCGGA GCAAGCTTTG TGGCTGGCGA AGCTTATAAC ACCGACGBCA ACGGACACGG	720
CACACATGTT GCCGGTACAG TAGCTGCGCT TGACAATACA ACGGGTGTAT TAGGCGTTGC	780
GCCAAGCGTA TCCTTGACG CGGTTAAAGT ACTGAATTCA AGCGGAAGCG GATCATACAG	840
CGGCATTGTA AGCGGAATCG AGTGGGCGAC AACAAACGGC ATGGATGTTA TCAATATGAG	900
CCTTGGGGGA GCATCAGGCT CGACAGCGAT GAAACAGGCA GTCGACAATG CATATGCAAG	960
AGGGGTTGTC GTTGTAGCTG CAGCAGGGAA CAGCGGATCT TCAGGAAACA CGAATACAAT	1020
TGGCTATCCT GCGAAATACG ATTCTGTCAT CGCTGTTGGT GCGGTAGACT CTAACAGCAA	1080
CAGAGCTTCA TTTTCCAGTG TGGAGCAGA GCTTGAAGTC ATGGCTCCTG GCGCAGGCGT	1140
ATACAGCACT TACCCAACGA ACACCTATGC AACATTGAAC GGAACGTCAA TGGTTTCTCC	1200
TCATGTAGCG GGAGCAGCAG CTTTGATCTT GTCAAAACAT CCGAACCTTT CAGCTTCACA	1260
AGTCCGCAAC CGTCTCTCCA GCACGGCGAC TTATTTGGGA AGCTCCTTCT ACTATGGGAA	1320
AGGTCTGATC AATGTGGAAG CTGCCGCTCA ATAACATATT CTAACAAATA GCATATAGAA	1380

AAAGCTAGTG TTTTAGCAC TAGCTTTTC TTCATTCTGA TGAAGGTTGT CCAATATTTT 1440
 GAATCCGTTT CATGATC 1457

(2) 配列番号 : 2

(i) 配列の特徴 :

- (A) 配列の長さ : 379アミノ酸
 (B) 配列の型 : アミノ酸
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(vi) 起源 :

- (A) 生物名 : バチルス・リチェニフォルミス (Bacillus Licheniformis)
 (B) 株名 : PWD-1

(xi) 配列 : 配列番号 2

Met Met Arg Lys Lys Ser Phe Trp Leu Gly Met Leu Thr Ala Phe Met
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Thr Met Ala Phe Ser Asp Ser Ala Ser Ala Ala Gln Pro
 20 25 30
 Ala Lys Asn Val Glu Lys Asp Tyr Ile Val Gly Phe Lys Ser Gly Val
 35 40 45
 Lys Thr Ala Ser Val Lys Lys Asp Val Ile Lys Glu Ser Gly Gly Lys
 50 55 60
 Val Asp Lys Gln Phe Arg Ile Ile Asn Ala Ala Lys Ala Lys Leu Asp
 65 70 75 80
 Lys Glu Ala Leu Lys Glu Val Lys Asn Asp Pro Asp Val Ala Tyr Val
 85 90 95
 Glu Glu Asp His Val Ala His Ala Leu Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly
 100 105 110
 Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly
 115 120 125
 Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Gln Ala Ser His
 130 135 140
 Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val
 165 170 175

Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Val
 180 185 190
 Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr
 195 200 205
 Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp
 210 215 220
 Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys
 225 230 235 240
 Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala
 245 250 255
 Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro
 260 265 270
 Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser
 275 280 285
 Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala Glu Leu Glu Val Met Ala
 290 295 300
 Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Thr Ser Met Val Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala
 325 330 335
 Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn
 340 345 350
 Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly
 355 360 365
 Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala Ala Gln
 370 375

【図1A】

PWD-1 CTCTGCCAAGCTGAAGCGGTCTATTCTACTTTTCGAAGCTGACATTTTCTTAAACAGTTNNTAATAACCAAMVMTTAAATTGGCC 90
 CTCCAAAAATAGGCTACCATATAATTCATTTTTTCTATAATAAATTAACAGATAATTTGAATAGATTATATTAICCTTCTATTT 180
 Corlsberg
 AAATTATTCTGAATAAAGAGGAGAGTGAGTAATGATGAGGAAAAAGAGTTTTTGGCTTGGGATGCTGACGGCTTCATGCTCGGTT 270
 M M R K K S F W L G M L T A F M L V F
 Preproprotein
 T M A F S D S A S A A Q P A K N V E K D Y I V G F K S G V K
 CACGATGGCATTACGGATTCCGCTTCTGCTCAACCGCGGAAAAATGTTGAAAGGATTATATTGTCGGATTTAAGTCAGGAGTGAA 360
 T A S V K K D V I K E S G G K V D K Q F R I I N A A K A K L
 ACCGCTATCTGTCAAAAGGACGTCATCAAGAGAGCGGGCGGAAAGTGGACAAAGCAGTTTGAATCATCAACGCAGCAAAACCGAAGCT 450
 D K E A L K E V K N D P D V A Y V E E D H V A H A L A Q T V
 AGACAAAGAGCGCTTAAGGAAGTCAAAAATGATCCGGATGTCGCTTAATGTTGGAAGAGGATCATGTGGCCCATGCTTGGCGCAACCGT 540
 P Y G I P L I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G
 TCCTTACGGCATTCCTCTCATTAAGCGGACAAAGTGCAGGCTCAAGGCTTTAAGGGAGCGAATGTAAAGTAGCCGTCCTGGATACAGG 630
 I Q A S H P D L N V V G G A S F V A G E A Y N T D G N G H G
 AATCCAAAGCTTCTCATCCGGACTTGACGCTAGTCGGCGGAGCAAGCTTTGTGGCTGGCGAAGCTTATAACACCGACGGCAACCGACACGG 720
 T H V A G T V A A L D N T T G V L G V E P S V S L Y A V K V
 CACACATGTTGCCGGTACAGTAGCTGGCGCTTGACAAATACAACGGGTGATTAAGCGTTGCGCAAGCGTATCCTTGTACGGGTTAAAGT 810

FIG. 1A.

【図1B】

L N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T T N G M D V I N M S
 ACTGAATTCAGCGGAGCGGATCATACAGCGGCATTGTAAAGCGGAATCGAGTGGCGACAAACGGCATGGATGTTATCAATATGAG 900
 .
 L G G A S G S T A M K Q A V D N A Y A R G V V V A A A G N
 CTTGGGGAGCATCAGGCTCGACAGCGATGAACAGGAGTCGACATGCAATGCAAGAGGGGTTCGTTGTAGCTGCAGCAGGGAA 990
 .
 S G S S G N T N T I G Y P A K Y D S V I A V G A V D S N S N
 CAGCGGATCTTCAGGAACACGGAATACCAATGGCTATCCCTGCGAAATACGATTCGTCTATCGCTGTGGTGGGTAGACTCTAACAGCAA 1080
 .
 R A S F S S V G A E L E V M A P G A G V Y S T Y P T N T Y A
 CAGAGCTTCATTTCCAGTGTGGGAGCAGAGCTTGAAGTCATGGCTCCCTGGCGAGCGGTATACAGCACTTACCCAAACCAACACTTATGC 1170
 .
 T L N G T S M V S P H V A G A A L I L S K H P N L S A S Q
 AACATTGAACGGAACGTCAATGGTTTCCTCATGTAGCGGAGCAGCAGCTTGTCTGTCAAAACATCCGAACCTTTCAGCTTCACA 1260
 .
 V R N R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q
 AGTCCGCAACCGTCTCTCCAGCAGCGGCACTTATTTGGGAAGCTCCTTCTACTATGGGAAGGTCTGATCAATGTCGAAGCTGCCGCTCA 1350
 .
 stop
 ATACATATTTCAACAATAGCATATAGAAAAAGCTAGIGTTTTTAGCACIAGCTTTTCTTTCATCTCTGATGAAGGTGTGCAATATTT 1440
 .
 GAATCCGTTCCATGATC 1457
 .

FIG. 1B.

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1996年5月20日

【補正内容】

請求の範囲（補正）

1. 配列番号1のDNA配列を持ち、ケラチナーゼをコードしている単離DNA分子。
。
2. ベクターDNAと、配列番号2のアミノ酸配列を持つケラチナーゼ酵素をコードしている上記請求項1記載の単離DNAとを含む組換えDNA分子。
3. 請求項2記載の組換えDNAを含み、配列番号2のアミノ酸配列を持つケラチナーゼ酵素を発現できる宿主細胞。
4. コードされているケラチナーゼを発現させることが可能な条件下で請求項3記載の宿主細胞を培養して細胞培養物を得る工程と、上記細胞培養物から上記ケラチナーゼ酵素を収集する工程とを含むケラチナーゼ酵素の製造方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 95/05635		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/57 C12N9/56		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.	
X	WO-A-89 09278 (NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY) 5 October 1989 see page 8, line 24 - page 11, line 33 ---	1-10
A	POULTRY SCIENCE, vol. 70, no. 1, 1991 page 74 XIANG LIN ET AL. 'Isolation of a feather-degrading keratinase from Bacillus licheniformis PWD-1.' see the whole document --- -/--	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underscore the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. 'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 September 1995	Date of mailing of the international search report 20.09.95	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 581 & Patentlaan 2 NL - 2210 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer Montero Lopez, B	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 95/05635

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 61, no. 4, April 1995 pages 1469-1474, XIANG LIN ET AL. 'Nucleotide sequence and expression of kerA, the gene encoding a keratinolytic protease of Bacillus licheniformis PWD-1.' see abstract see page 1472, right column, paragraph 1 - page 1473, right column, paragraph 2; figure 9 -----</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No
PCT/US 95/05635

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8909278	05-10-89	US-A- 4959311	25-09-90
		JP-T- 3504676	17-10-91
		US-A- 5063161	05-11-91
		US-A- 5171682	15-12-92

